ся на высокой чувствительности, строгой специфичности, результативности и быстроте анализа. Время исследования сокращается до 2-х суток, что особенно актуально при исследовании продуктов с ограниченным сроком годности.

SUMMARY

The results of our experiments on approbating the LOCATE® Listeria test-system to detect Listerya in the foods with ELISA are presented in the paper. LOCATE® Listeria sensitivity in experiments was found to be 102 microbial cells/ml. The test system being used in the experiments with the various Enterobacteriaceae representatives proved to have a high specifity and reduce the experimental period up to 48 hrs.

Литература

1. Бакулов И.А. Основные вехи изучения листериоза животных и людей. Материалы международного симпозиума «Листериоз на рубеже тысячелетий». Покров.1999 250 с
2. Карликанова Н.Р., Куваева И.Б., Карликанова С.Н. Листерии в молоке и молочных продуктах. Москва-Углич. 1999 123 с
3. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева В.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех. 2002 195 с
4. НАССР/ХАССП Системы анализа рисков и определения критических контрольных точек - Государственные стандарты США и России. ВНИИС. Москва. 2002-300с
5. Куликовский А.В. Эмерджентные пищевые зоонозы.М., изд-во «Крафт+»,2004,174 с.
6. Макаров В.В., Смирнов А.М., Сочнев В.В., Алиев А.А. Эмерджентность, черезвычайные ситуации и зоонозы. Ветеринарная патология, № 3 (10), 2004, с.36-45.

А.С. Малоголовкин, Г.А. Надточей, О.Н. Жигалева, В.Г. Бурдинский, М.Б. Новикова

(Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я. Р. Коваленко (г. Москва), Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной вирусологии и микробиологии (г. Покров))

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОМА ЦИРКОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ СВИНЕЙ

Введение

В инфекционной патологии свиней немаловажное значение имеют недавно получившие широкое распространение болезни, ассоциированные с цирковирусами.

Первые упоминания о цирковирусах свиней (ЦВС) появились в 1991 г., когда в Канаде было выявлено новое заболевание – синдром послеотъёмного мультисистемного истощения (СПМИ). Эту болезнь наблюдали у поросят 6-14 недельного возраста, сопровождающуюся истощением, одышкой, диареей, желтушностью кожи.

В настоящее время СПМИ широко распространён во всех странах мира с развитым свиноводством и причиняет значительный экономический ущерб. Заболеваемость молодняка составляет от 5 до 20%, а в некоторых хозяйствах – 50-70%. Летальность при данном заболевании довольно высока и может достигать 80 -100% [1]. В России цирковирусы свиней впервые были выявлены в 2000 г. [3].

Цирковирусы свиней содержат односпиральную кольцевую ковалентнозамкнутую молекулу ДНК и относятся к роду Circovirus семейства Circoviridae. К цирковирусам свиней относят ЦВС типа 1 и ЦВС типа 2.

ЦВС типа 1 был обнаружен в 1974 г. и получил широкое распростанение в Северной Америке и странах Западной Европы. ЦВС типа 1 является нецитопатогенным контаминантом перевиваемой культуры клеток почек поросят РК-15.

ЦВС типа 2 открыт в 1991 г. Ticher I. (Канада) и был признан первичным этиологическим агентом СПМИ у поросят. Однако существуют данные о наличии ЦВС типа 2 при таких заболеваниях как конгенитальный тремор и дерматит и синдром нефропатии (ДСНП) [1, 2, 4].

Особенно остро в настоящее время встает вопрос о дифференциальной диагностике ЦВС обоих типов между собой и от возбудителей других болезней. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволяет намного облегчить и ускорить идентификацию инфекционных агентов [3].

В связи с этим задачей данных исследований было усовершенствование отдельных

Таблица

Результаты исследования патологического материала

Места отбора проб	№ пробы	Патологический материал	ЦВС - 2
Белгородская обл.	1	брыжейка кишечника	-
	2	брыжейка кишечника	-
	3	брыжейка кишечника	-
	4	брыжейка кишечника	-
Владимирская обл.	1	легкие	-
	2	легкие	-
	3	легкие	+
	4	легкие	-
	5	легкие	+
	6	легкие	-
	7	легкие	+
	8	лимфатические узлы	+
	9	лимфатические узлы	+
	10	легкие	-
	11	легкие	+
	12	лимфатические узлы	-
	13	лимфатические узлы	-
	14	лимфатические узлы	-
	15	лимфатические узлы	-
	16	лимфатические узлы	-
	17	легкие	-
	18	легкие	+
	19	легкие	-
	20	легкие	-
Тульская обл.	1	лимфатические узлы	-
	2	лимфатические узлы	-
	3	лимфатические узлы	-
	4	селезенка	-

Примечание: «+» — положительный, «-» — отрицательный результаты

этапов постановки ПЦР, с целью выявления и дифференциации ЦВС обоих типов.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие культуры клеток: различные клоны перевиваемой линии клеток почки свиньи PK-15; перевиваемая линия клеток почки свиньи SK-6; перевиваемая линия клеток почки овцы (ПО); перевиваемая линия клеток почки африканской зелёной мартышки Vero; перевиваемая линия клеток почки сибирского горного козерога (ПСГК); перевиваемая линия клеток почки зелёной мартышки CV-1.

Клиническим материалом для исследований являлись пробы лимфоузлов, брыжейки кишечника, легких, селезенки от вынужденно убитых поросят 35-36 дневного возраста из хозяйств Владимирской, Белгородской и Тульской областей со следующими клиническими признаками: диарея, отказ от корма, кашель, угнетенное состояние, потеря в весе.

Для выделения вирусной РНК осветляли приготовленную суспензию органов центрифугированием 15 мин при 12 тыс об/мин. Экстрагирование РНК осуществляли с использованием гуанидинового лизирующего буфера с последующей фенольно-хлороформенной (1x1) экстракцией.

Постановку ПЦР проводили в реакционной смеси следующего состава: 2,5 мкл 10х буфера, 3 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 2 ед. Taq-полимеразы. по 10 pm каждого праймера, 2 мкл раствора выделенной вирусной ДНК и воду до конечного обьёма 25 мкл, сверху наслаивали 30 мкл минерального масла.

Размеры полученных продуктов ПЦР определяли после проведения электро-

фореза в 2% геле агарозы, содержащем 0.001% бромистого этидия, при силе тока 50 мА и напряжении 170 В.

Результаты и обсуждение

В работе использовали несколько пар праймеров, рассчитанных на основе нуклеотидных последовательностей цирковирусов свиней типа 1 и 2, представленных в базе данных GenBank.

С помощью компьютерных программ «Oligo 6.0», «BioEdit» нами было разработано несколько программ для постановки ПЦР, позволяющих заметно уменьшить время постановки реакции и повысить ее специфичность. Амплификацию проводили на ДНК- амплификаторе «Терцик» фирмы ДНК-Технология по следующей программе: : денатурация 940 — 2 мин 1 цикл, 940 — 20 сек; отжиг 620 — 10 сек; элонгация 720 — 20 сек, всего 35 циклов. Приведенную выше программу использовали с различными комбинациями праймеров.

В результате работы исследовали несколько комбинаций праймеров: Е-23 и Е-24 для идентификации ЦВС типа 2 (длина продукта 416 п. н.) и праймеры Е-22, Е-29, Е-30 – для обнаружения ЦВС типа 1 и типа 2, из которых Е-22 универсальный для обоих типов ЦВС, Е-29 — праймер специфичный к ЦВС тип 1 (длина продукта 790 п. н.), Е-30 – специфичный к ЦВС тип 2 (длина продукта 890 п. н.). Из этого разнообразия нам удалось получить комбинацию трех праймеров, которая позволяет выявлять и дифференцировать ЦВС обоих типов по размеру ПЦР фрагментов.

Также нам удалось подобрать оптимальные условия для постановки ПЦР при идентификации генома ЦВС, что в конечном итоге привело к сокращению времени постановки реакции до 1ч. 15 минут.

Разработанную программу с универсальным (Е-22) и типоспецифическими праймерами (Е-29 и Е-30), применили при исследовании различного патологического материала и перевиваемых культур клеток.

Результаты исследования патологического материала представлены в таблице. Как видно из таблицы, ЦВС-2 обнаруживали в семи из 28 проб. При этом ДНК вируса выявляли только в лёгких и лимфатических узлах.

Известно, что использование контаминированных цирковирусами свиней культур клеток для изготовления живых вакцин, может представлять потенциальную опасность, в связи с возможностью инфицирования вирусами вакцинируемых животных.

Для исследования клеточных культур на предмет контаминации их цирковирусами свиней использовали следующие линии клеток: PK-15 (Португальская линия), PK-15 (Американская линия), SK-6, Vero (культура клеток почки африканской зелёной мартышки), CV-1, ПСГК. Полученные результаты показали, что в тестируемых образцах отсутствовала ДНК ЦВС типа1 и ЦВС типа 2.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что предлагаемая методика оптимизации постановки ПЦР может быть использована для выявления цирковирусов свиней в пробах патологического материала и клеточных культурах.

Литература

1. Орлянкин Б.Г., Алипер Т.Н., Непоклонов Е.А. «Современные представления о цирковирусах свиней». Сельскохозяйственная биология, 2002 г., №6
2. Сатина Т.И. «Цирковирусные инфекции свиней»/ Обзор литературы. Владимир. Изд-во ВНИИЗЖ, 2003 г., 100 с.
3. Тимина А. М. «Разработка методов лабораторной диагностики цирковирусной инфекции свиней». Автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук. Владимир, 2006 г.
4. Allan Grodon M., Ellis John A. Porcine circovirus: a review// J. Vet. Diagn. Invest 2000-12, №1 с. 3-14.

УДК: 619.615

Т.В. Новосадюк

(Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины)

СТАНОВЛЕНИЕ СОВРЕМЕННОЙ ВЕТЕРИНАРНОЙ ГОМЕОПАТИИ

Успехи практической гомеопатии общеизвестны. В настоящее время отмечается значительное повышение интереса к этому методу лечения, что способствует стремительному внедрению гомеопатии в ветеринарную практику. Перспективы